动态浊度法内毒素检测鲎试剂盒
使用说明书

【产品标准号】KT

【名称】动态浊度法内毒素检测鲎试剂盒
Kinetic Turbidimetric Tachypleus Amebocyte Lysate Assay Kit for Endotoxin Detection

【用途】用于体外细菌内毒素的定量检测，禁止以任何途径进入机体。

【原理】鲎试剂为鲎科动物东方鲎的血液变形细胞溶解物的冷冻干燥品，鲎试剂中含有C因子、B因子、凝固酶原、凝固蛋白原等。在适宜的条件下(温度，pH 值及无干扰物质)，细菌内毒素激活 C 因子，引起一系列酶促反应，使鲎试剂产生凝集反应形成凝胶。随着凝胶的形成，反应液的吸光度(OD 值，浊度)增加，OD 值增加的速度与内毒素浓度成正相关。换言之，OD 值上升某一预设限值(启动 OD)所需要的时间(定义为启动时间)与内毒素浓度成负相关，启动时间的对数与内毒素浓度的对数成线性关系，据此，可以定量供试品的内毒素浓度。

【检测限】见出厂检验报告。

【贮存】阴凉处，最佳 2-8ºC，避光。

【有效期限】见出厂检验报告。

【注意事项】

① 该试剂盒用于体外细菌内毒素的定量检测，严禁试剂以任何途径进入机体。

② 接触试剂及供试品的所有器皿必须是除热原的。试验过程应防止微生物的污染。
该说明书中的除热原指内毒素浓度小于 0.005 EU/ml。

③ 供试品的 pH 值应在 6.0 – 8.0 之间，若超出此范围，需用除热原的缓冲液、0.1M 氢氧化钠或 0.1M 盐酸调节。

④ 当供试品中可能存在鲎试验的干扰物质时，须进行干扰试验，参见【供试品的干扰试验】。

【用法】

1. 材料和设备

1.1 试剂：内毒素工作标准品、鲎试剂、细菌内毒素检查用水。

1.2 器材：
除热原试管、除热原吸头、除热原加样槽、除热原 96 孔微板。
旋涡混合器、移液器、多道移液器、试管架。
带温育系统的动态光度测定仪器及配套软件，例如，微板鲎试仪 ELx808 及软件 TALgent 或 Gen5。

2. 实验操作

2.1 动态光度测定仪器的设定，以微板鲎试仪 ELx808 为例：
预热仪器， 设置温育温度为 37ºC。
设置模板及程序。
设定读板波长为 340nm，设定动力学参数：读板 120 分钟， 每 30 秒读一次。

2.2 内毒素标准溶液配制

2.2.1 标准曲线所采用的内毒素浓度可以为 2 至 10 倍稀释的系列 (如 0.5，0.25，0.125，0.0625EU/ml 或 10，1，0.1，0.01EU/ml))。

2.2.2 取内毒素工作标准品 1 支，用砂轮沿安瓿颈部划痕，开启，加入适量（建议在 0.5 ml - 1.2 ml 之间）细菌内毒素检查用水，置旋涡混合器上剧烈振摇 5 分钟。

2.2.3 将上述内毒素溶液进一步用细菌内毒素检查用水稀释成所需浓度，每稀释一步均应在旋涡混合器上剧烈振摇 1 分钟。
稀释的内毒素溶液静置时间超过 10 分钟，用前在旋涡混合器上剧烈振摇 1 分钟，放置 4 小时以上的内毒素溶液应丢弃。
(参见《内毒素工作标准品使用说明书》)。

2.3 阴性对照为细菌内毒素检查用水。

2.4 鲎试剂的溶解：按标示量加细菌内毒素检查用水于鲎试剂中，轻轻振摇使鲎试剂完全溶解。注意不要用旋涡混合器剧烈振摇。溶解的鲎试剂应在 10 分钟内使用。

若采用多道移液器，将溶解的鲎试剂转移到除热原加样槽，并轻轻摇匀。

2.5 实验操作

微板鲎试仪 ELx808：

取除热原微板，在各孔中分别加入 100μl 细菌内毒素检查用水、内毒素标准溶液，或供试品。

将微板放置于鲎试仪中，37℃ 温育 10 分钟。

温育结束，用移液器或多道移液器加入 100μl 鲎试剂（避免产生气泡!），中速振摇 10 秒混匀，在 340nm 波长处，每 30 秒（到 60 秒）读一次，读板 120 分钟。

3.数据处理

设定启动 OD(可以设为 0.05, 一般可以在 0.04 到 0.06 之间)，软件自动给出其启动时间(T)。

建立标准曲线：$\lg T = b \lg C + a$， 其中

T 为启动时间， C 为内毒素的浓度， b 为直线斜率， a 为 Y 轴截距。

当实验数据同时满足如下三个条件时实验才有效：

① 标准曲线的浓度点 ≥ 3，标准曲线的相关系数 $r \leq -0.980$，

② 标准曲线最低点的 T 值小于阴性对照的 T 值，

③ 供试品平行管的平均值在标准曲线的区间内。

【供试品的干扰试验】

① 当对新药或无内毒素检查项的品种建立内毒素检查法时，必须进行干扰试验；

② 当鲎试剂、供试品的来源、配方、生产工艺改变，或试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时，必须重新进行干扰试验；

③ 当供试品中可能存在鲎试验的干扰物质时，须进行干扰试验。

步骤如下：

1. 选择标准曲线中点或一个靠近中点的内毒素浓度（设为 λm），作为供试品干扰试验中添加的内毒素浓度，如采用标准曲线为 10，1，0.1，0.01EU/ml 系列时, 可以用供试品配制 0.1EU/ml 内毒素浓度作为实验的供试品阳性对照。
2. 用供试品溶液配制浓度为 λm 的内毒素溶液（即含 λm 内毒素的供试品阳性对照），测量出该溶液的内毒素浓度, 称为 Cs；
3. 测量出未添加外源内毒素的供试品溶液内毒素浓度, 称为 Ct；
4. 计算该试验条件下的回收率 $R = (Cs - Ct)/\lambda m \times 100\%$
5. 当 R 在 50%～200%之间，则认为在此试验条件下供试品溶液不存在明显干扰作用。
6. 当 R 在 50%～200%之外，需对供试品进行系列稀释或进行其它处理消除干扰, 每一稀释溶液都重复步骤 2-4, 直到内毒素的回收率 R 在 50%～200%之间。选择回收率 R 最接近 100%的稀释倍数进行内毒素检测。

(参见《中华人民共和国药典》2010 版中《细菌内毒素检查法》)

【批准文号】[88]卫药准字 SJ-02 号

【规格】见出厂检验报告。

【生产企业】厦门市鲎试剂实验厂有限公司

总部地址：厦门市海沧新阳工业区新嘉路 131 号（361022）

销售服务：0592-2085561，xmhoushiji@126.com

技术交流：0592-6518659，xm_tal@126.com

传　　真：0592-2095294

网　　址：www.houshiji.com